

董晶,张焱,曹赵茹,等. 藜麦总黄酮的超声波法提取及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):267-269.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.097

藜麦总黄酮的超声波法提取及抗氧化活性

董晶,张焱,曹赵茹,李志英
(忻州师范学院化学系,山西忻州 034000)

摘要:用超声法探讨提取藜麦黄酮的最佳工艺,并测定其自由基的清除能力及对淀粉酶的降解作用。结果表明,最佳提取条件为:料液比为1 g:50 mL,乙醇浓度80%,提取温度50℃,提取时间30 min,超声功率为240 W。藜麦黄酮提取液对DPPH·、·OH的清除能力分别为89.3%、86.6%,对淀粉酶的抑制率为41.38%。

关键词:藜麦;黄酮;抗氧化性

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)04-0267-03

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)原产于南美洲安第斯山区,是印加土著居民的传统食物,有7 000多年的种植历史。联合国粮农组织认为,藜麦是唯一的单体植物即可满足人体基本营养需求的食物^[1]。藜麦含有丰富的类黄酮物质,有助于血液循环、软化血管,可明显促进糖脂代谢、胰岛素分泌,对糖尿病有很好的疗效。藜麦黄酮具有抗氧化^[2]、抗癌及防癌^[3]、降压及降血脂、改善微循环、抑菌、消炎等功效,是极具开发前景的天然有机抗氧化剂。本研究对藜麦黄酮的最佳提取条件进行了探究,并研究了其体外清除DPPH·、·OH自由基的能力,旨在为开发利用藜麦资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

藜麦(山西稼祺农业科技有限公司)。准确称取0.020 2 g 芸香苷标准样品(北京化学试剂公司),用少量无水乙醇溶解后用80%无水乙醇定容至100 mL容量瓶中,得0.202 mg/mL芸香苷溶液。准确称取5 g硝酸铝(天津市风船化学试剂科技有限公司),用蒸馏水定容于100 mL容量瓶中,即得5%硝酸铝溶液。准确称取0.166 8 g硫酸亚铁(天津市风船化学试剂科技有限公司),用少量蒸馏水溶解,定容于100 mL容量瓶中,得6 mmol/L硫酸亚铁溶液。准确移取0.6 mL 30%过氧化氢(天津市风船化学试剂科技有限公司),定容于1 L容量瓶中,得6 mmol/L H₂O₂溶液。准确称量0.082 9 g水杨酸(天津市申泰化学试剂公司),用少量无水乙醇溶解,定容于100 mL容量瓶中,得6 mmol/L水杨酸溶液。准确称取19.716 mg DPPH·,用无水乙醇溶解定容至250 mL容量瓶中,得2×10⁻⁷ mol/L DPPH·溶液。其他试剂均为分析纯,试验用水为二次蒸馏水。

1.2 主要仪器

UV-2550型紫外-可见分光光度计[日本岛津公司(苏州)],FA22048电子天平(上海精密科学仪器有限公司),KQ-400KDE型台式高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),723型分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 藜麦黄酮的提取方法 将新鲜的藜麦置于65℃烘箱内烘干至恒质量,粉碎后过60目筛,备用。称取藜麦粉末2 g置于100 mL锥形瓶中,加入80 mL 80%乙醇溶液,240 W 50℃下超声提取30 min,用80%乙醇溶液定容至100 mL容量瓶中,抽滤,作为待测液^[3]。

1.3.2 藜麦黄酮的测定方法 精密称取干燥至恒质量的芸香苷标准品0.020 2 g置于烧杯中,用少量的无水乙醇溶解,并用80%乙醇溶液定容于100 mL容量瓶中,摇匀。准确吸取标准样品0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL,分别置于10 mL比色管中,加入5% Al(NO₃)₃ 1 mL,用80%乙醇溶液定容,摇匀,静置5 min。在405 nm处测定吸光度。当芸香苷浓度范围为4.04~20.2 μg/mL时,与吸光度有良好的线性关系^[4],得回归方程: $D=0.0343C+0.0102$, $r^2=0.999$ 。准确量取稀释后的提取液0.5 mL,按标准曲线的方法测定其吸光度。黄酮得率(W)计算公式如下:

$$W = V / (f \times m \times 1000) \times 100\% \quad (1)$$

式中: V 为提取液总体积, f 为稀释倍数, m 为藜麦总质量。

1.3.3 藜麦黄酮抗氧化性研究

1.3.3.1 对DPPH·清除率的测定 以最优条件提取藜麦黄酮,稀释、定容,得0.202 mg/mL藜麦黄酮提取液。用无水乙醇分别配制不同浓度藜麦黄酮溶液。在10 mL比色管中分别加入待测溶液1 mL与DPPH·溶液2 mL,混匀,避光静置30 min,在517 nm处测定吸光度 D 。每一吸光度平行测定3次,取平均值。清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = (D_{\text{空白}} - D_{\text{样品}} + D_{\text{对照}}) / D_{\text{空白}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $D_{\text{空白}}$ 表示2 mL无水乙醇代替待测液得到的吸光度;

$D_{\text{对照}}$ 表示2 mL无水乙醇代替待测液得到的吸光度。

1.3.3.2 对羟自由基(·OH)清除率的测定 利用H₂O₂对Fe²⁺混合产生·OH,在体系内加入水杨酸捕捉·OH并产生有色物质,该物质在510 nm下有最大吸光度。准确吸取1 mL不同质量浓度的藜麦黄酮提取液置于10 mL比色管中,

收稿日期:2014-05-20

基金项目:忻州师范学院应用化学创新实践基地(编号:院政字201331);忻州师范学院大学生科技创新项目(编号:2012.1022)。

作者简介:董晶(1992—),从事分析化学研究。

通信作者:李志英,教授,从事分析化学教学与科研工作。E-mail:lizhiying8001@163.com。

依次加入 2 mL 6 mmol/L FeSO₄、2 mL 6 mmol/L 水杨酸-乙醇、2 mL 6 mmol/L H₂O₂, 37 °C 反应 30 min, 以蒸馏水为参比, 在 510 nm 下测量各浓度的吸光度^[5]。不同浓度藜麦黄酮溶液 1 mL 为黄酮的本底吸收。清除率计算公式如下:

$$\cdot \text{OH 清除率} = \frac{D_0 - (D_i - D_j)}{D_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: D_0 表示不加提取液时空白溶液的吸光度; D_i 表示加入提取液时溶液的吸光度; D_j 表示不加 H₂O₂ 提取液本底的吸光度。

1.3.4 降糖作用的测定 α -淀粉酶水解淀粉为还原糖, 3,5-二硝基水杨酸 DNS 与还原糖反应显示红棕色, 540 nm 处比色, 定量测定 α -淀粉酶的活性。取 0.3 mL α -淀粉酶 37 °C 预热 5 min, 加入 0.4 mL 1% 淀粉溶液在 37 °C 下反应 5 min, 加入 0.2 mL DNS, 沸水浴 5 min 后, 取出冷却, 定容至 25 mL, 540 nm 下测定吸光度^[5]。在反应体系中加入不同浓度提取液 1 mL, 空白对照为不加提取液(以蒸馏水补足)。背景对照为对应浓度的提取液, 反应终止后用蒸馏水稀释定容至 25 mL, 于 540 nm 处测其吸光度。抑制剂对 α -淀粉酶的抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{D_3 - D_4}{D_1 - D_2}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中: D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 分别为 540 nm 处空白、空白对照、提取液、背景对照的吸光度。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度的影响

称取 2 g 样品, 分别加入 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液 80 mL, 超声功率 240 W 30 °C 超声辅助提取 30 min, 定容至 100 mL 容量瓶中, 抽滤。准确吸取 2 mL 提取液, 测其吸光度, 得黄酮得率与乙醇浓度的关系。由表 1 可知, 黄酮得率随乙醇浓度的增加而增加, 当乙醇浓度达 80% 时, 黄酮得率最大, 当乙醇浓度再增大时, 黄酮得率开始下降, 因此乙醇最佳浓度为 80%。

表 1 乙醇浓度的选择

乙醇浓度(%)	黄酮得率(%)
50	0.20
60	0.23
70	0.24
80	0.34
90	0.26

2.2 料液比的影响

称取 2 g 样品, 分别加入 20、30、40、50、60 mL 80% 乙醇, 240 W 30 °C 超声辅助提取 30 min, 定容至 100 mL 容量瓶中, 抽滤。准确吸取 2 mL 提取液, 测其吸光度, 得黄酮得率与料液比的关系。由表 2 可知, 黄酮得率随着料液比的增大而增加, 当料液比为 1 g : 50 mL 时黄酮得率最大, 当料液比再增大时, 黄酮得率开始下降, 因此最佳料液比为 1 g : 50 mL。

2.3 提取时间的影响

称取 2 g 样品, 加入 80 mL 80% 乙醇溶液, 240 W 30 °C 超声辅助提取 10、20、30、40、50 min, 定容至 100 mL 容量瓶中, 抽滤。准确吸取 2 mL 提取液, 测其吸光度, 得到黄酮得率与

表 2 料液比的选择

料液比(g : mL)	黄酮得率(%)
1 : 20	0.21
1 : 30	0.29
1 : 40	0.33
1 : 50	0.42
1 : 60	0.30

提取时间的关系。由表 3 可知, 黄酮提取率随提取时间的增大而增加, 当提取时间为 30 min 时, 黄酮提取率最高, 继续延长提取时间, 黄酮提取率下降, 因此最佳提取时间为 30 min。

表 3 提取时间的选择

提取时间(min)	黄酮得率(%)
10	0.25
20	0.31
30	0.33
40	0.31
50	0.28

2.4 提取温度的影响

称取 2 g 样品, 分别加入 80 mL 80% 乙醇溶液, 分别在 30、40、50、60、70 °C 超声辅助提取 30 min, 超声功率 240 W, 定容至 100 mL 容量瓶中, 抽滤。准确吸取 2 mL 提取液, 测其吸光度, 得黄酮得率与提取温度的关系。由表 4 可知, 黄酮得率随提取温度的增大而增加, 当提取温度为 50 °C 时黄酮得率最大, 再增加提取温度, 黄酮得率开始下降, 因此最佳提取温度为 50 °C。

表 4 提取温度的选择

提取温度(°C)	黄酮得率(%)
30	0.21
40	0.27
50	0.32
60	0.29
70	0.28

2.5 超声功率的影响

称取 2 g 样品, 分别加入 80 mL 80% 乙醇溶液, 30 °C 分别在 160、200、240、280、320 W 功率下超声辅助提取 30 min, 定容至 100 mL 容量瓶中, 抽滤。准确吸取 2 mL 提取液, 测其吸光度, 得黄酮得率与超声功率的关系。由表 5 可知, 黄酮得率开始随超声功率的增大而增加, 当功率为 240 W 时黄酮得率最大, 再增大超声功率, 黄酮得率下降, 因此最佳超声功率为 240 W。

表 5 超声功率的选择

超声功率(W)	黄酮得率(%)
160	0.26
200	0.28
240	0.34
280	0.31
320	0.29

2.6 机理探讨

准确吸取芸香苷标准品溶液、藜麦黄酮提取液各 2 mL, 分别置于 10 mL 比色管中, 各加入 1 mL Al(NO₃)₃ 溶液, 振荡, 用 80% 乙醇溶液定容, 摇匀, 静置 5 min。用紫外可见分光光度计确定最大吸收波长。在 300~600 nm 波长范围内扫

描,得标准品、提取液的吸收光谱。由图1可知,标准品配合物、提取液配合物的最大吸收波长均为405 nm,故本试验用该波长作为测定波长。

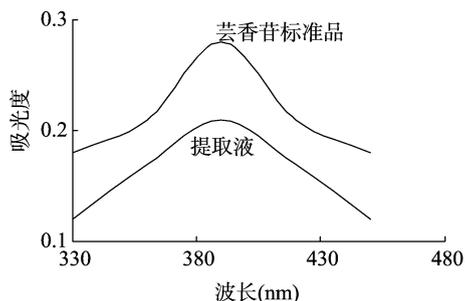


图1 标准品、提取液的最大吸收波长

2.7 藜麦黄酮抗氧化性

2.7.1 藜麦黄酮对 DPPH· 的清除作用 DPPH 自由基有单电子,在 517 nm 处有一强吸收,其醇溶液呈紫色。当藜麦黄酮存在时,由于与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,其褪色程度与其接受电子数量成定量关系。由表 6 可知,藜麦黄酮对 DPPH· 清除效果明显,在 5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,清除率随着质量浓度的增加而增大,在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时有最大清除率(89.3%),说明藜麦黄酮对 DPPH· 有很好的清除作用。

表 6 藜麦黄酮对 DPPH· 的清除作用

藜麦黄酮质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	清除率 (%)
5	22.8
10	39.7
15	56.8
20	79.3
25	89.3
30	89.3

2.7.2 藜麦黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用 羟基自由基是一种化学性质极强的活性分子,也是危害最大的自由基之一。由表 7 可知,藜麦黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除效果明显,在 5~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,清除率随着质量浓度的增加而增大,当质量浓度达 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,清除率最大,说明藜麦黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)有很好的清除作用。

2.7.3 藜麦黄酮提取液对 α -淀粉酶的抑制作用 分别取 2、3、4 mL 提取液,计算抑制率。由表 8 可知,藜麦黄酮提取

表 7 藜麦黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)的清除作用

藜麦黄酮质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	清除率 (%)
5	19.7
10	25.6
15	55.9
20	86.6
25	86.6
30	86.5

表 8 藜麦黄酮提取液对 α -淀粉酶的抑制作用

黄酮体积(mL)	抑制率(%)
2	37.26
2	37.93
3	32.14
3	29.41
3	33.33
4	41.38

液对 α -淀粉酶有抑制作用,且其浓度与抑制率正相关。

3 结论

本试验研究了超声辅助法提取藜麦中黄酮的提取工艺,结果表明,超声波法的最佳提取条件为:料液比 1 g : 50 mL,乙醇浓度 80%,提取温度 50 $^{\circ}\text{C}$,提取时间 30 min,超声功率 240 W。藜麦黄酮对 DPPH·、羟自由基($\cdot\text{OH}$)具有较强的清除作用。本试验证实了黄酮具有清除自由基、抗氧化的功效,是一种有效的自由基清除剂。

参考文献:

- [1] 万丽英. 苦荞麦的营养与开发应用前景[J]. 农业科技通讯, 2010(9):90-92.
- [2] 汤容,樊瑞霞. 大豆异黄酮抗癌作用的研究进展[J]. 中国药理学杂志,1999,34(7):3-6.
- [3] 王文平,梁海玲,姚元华. 木瓜提取物中总黄酮含量的测定[J]. 贵州医药,2005,29(6):546-548.
- [4] 薛梅,黄国强,陈宏伟. 木瓜中总黄酮的提取及含量测定[J]. 淮海医药,2004,22(2):156.
- [5] 吴春,陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(5):24-27.
- [6] 李放. 无公害对虾与青蟹混养技术[J]. 技术与市场,2009,16(12):153.
- [7] 高雪娟,卜利源. 南美白对虾与河蟹的池塘混养试验[J]. 水利渔业,2004,24(5):51,83.
- [8] 姜存楷. 对虾塘蛭混养技术[J]. 科学养鱼,1999(7):15.
- [9] 朱振乐. 杂色蛤与对虾混养技术[J]. 水产科学,2001,20(4):28-28.
- [10] 赵春光. 虾蟹混养新技术[J]. 饲料研究,2002(9):35,34.
- [11] 叶文柏. 虾蟹混养新技术[J]. 北京水产,2004(3):25.
- [12] 胡永华,钱伦. 池塘虾蟹混养技术要点[J]. 渔业致富指南,2012(21):50-51.
- [13] 李敦岳,张清毅. 池塘虾蟹混养试验[J]. 科学养鱼,2012(3):32-33.
- [14] 郑春波,王世党,于诗群,等. 中国对虾与红鳍东方鲀混养技术初探[J]. 齐鲁渔业,2005,22(5):11-12.
- [15] 郭泽雄. 高位池南美白对虾与鲮鱼混养技术初探[J]. 科学养鱼,2004(3):32-33.
- [16] 刘宝金,刘德永,刘宝明,等. 三疣梭子蟹与对虾混养技术[J]. 中国水产,2001(5):58-59.
- [17] 穆占昆,杨振国,周玉,等. 中国对虾和三疣梭子蟹混养试验[J]. 水产科学,2001,20(5):16-18.
- [18] 陈延坎. 虾池混养锯缘青蟹技术[J]. 中国水产,2003,6(1):60-61.
- [19] 梁华芳,邱国,陈康惜. 利用老化虾塘进行斑节对虾与锯缘青蟹混养试验[J]. 海洋科学,2003,27(7):10-12,42.

(上接第 240 页)